



Izolacja autoantygeny przysadkowego metodą chromatografii powinowactwa

Isolation of pituitary autoantigen by affinity chromatography

Paweł Gut, Jerzy Kosowicz, Katarzyna Ziemnicka, Maciej Bączyk, Jerzy Sowiński

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Streszczenie

Wstęp: Na podstawie wcześniejszych badań można stwierdzić, że przeciwciała przysadkowe skierowane przeciw autoantygenom frakcji mikrosomalnej ludzkich przysadek występują w surowicach pacjentów z chorobami przysadki, jak również u pacjentów z chorobami autoimmunizacyjnymi gruczołów dokrewnych. Dotychczas nie udało się jednak dokonać szczegółowej charakterystyki antygeny przysadkowego. Dlatego celem niniejszej pracy była próba izolacji autoantygeny przysadkowego metodą chromatografii powinowactwa, z zastosowaniem surowic chorych o wysokim mianie autoprzeciwciała przysadkowych, oraz frakcji mikrosomalnej ludzkich przysadek.

Materiał i metody: Do izolacji immunoglobulin użyto surowic pacjentów z chorobami przysadki, chorobą Addisona oraz chorobą Gravesa-Basedowa, które wykazywały silną reakcję immunologiczną z antygenami przysadkowymi w metodzie immunoblottingu. Do izolacji antygeny przysadkowego użyto frakcji mikrosomalnej ludzkich przysadek, otrzymanej drogą ultrawierowania i solubilizacji. Izolację immunoglobulin przeprowadzono na kolumnie sefaroza 4B-białko A, które następnie wykorzystano do sporządzenia immunosorbentu na CNBr-aktywowanej sefarozie. Desorpcji białek antygenowych dokonano przy użyciu glicyny (0,2 mol/l) oraz guanidyny (1 mol/l i 3 mol/l). Ocenę wyizolowanych białek przeprowadzono metodą immunoblottingu.

Wyniki: Izolację immunoglobulin z surowic chorych przeprowadzono 12-krotnie, otrzymując 8,5–13,5 mg IgG z 1–1,5 ml surowicy. W wyniku desorpcji antygenów przysadkowych z immunosorbentu otrzymano 0,026–0,150 mg białek antygenowych. Dla określenia masy cząsteczkowej i czystości antygeny mikrosomalnej przysadek uzyskanego drogą chromatografii powinowactwa, wyizolowane białka były znakowane izotopem ^{125}I oraz rozdzielone elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) z następującą autoradiografią. Wyniki autoradiogramów wykazały obecność dwóch silnie zaznaczonych prążków białek o masie 67 kDa i 55 kDa oraz białka niskocząsteczkowe.

Wnioski: Izolacja autoantygeny przysadkowego z zastosowaniem metody chromatografii powinowactwa pozwoliła otrzymać dwie frakcje białek antygenowych o różnych ciężarach właściwych — 55 kDa i 67 kDa. (*Endokrynol Pol* 2009; 60 (6): 455–460)

Słowa kluczowe: autoantygen przysadkowy, izolacja, autoprzeciwciała przysadkowe

Abstract

Introduction: In sera of pituitary disease patients and other autoimmune endocrine disease are detectable pituitary autoantibodies. Until now characterization of pituitary antigen is still unknown. The aim of our study was isolation and characterization of pituitary autoantigen by affinity chromatography. For isolation we have used microsomal fraction of human pituitary.

Material and methods: For immunoglobulins isolation have been used sera of pituitary disease, Addison disease and Graves-Basedow disease patients with detectable pituitary autoantibodies. For pituitary antigen isolation have been used microsomal fraction of human pituitary obtained by ultracentrifugation and solubilisation. Immunoglobulins isolation was performed on Sepharose 4B-Protein A. Immunosorbent was performed on CNBr-activated Cl-4B Sepharose. Desorption was conducting by 0.2 mol/L glycine and 1 mol/L, 3 mol/L guanidine. The estimation of isolated proteins was performed by immunoblotting.

Results: Isolation of immunoglobulins from patients sera was done 12 times receiving from 8.5 up to 13.5 mg of IgG from 1–1.5 ml of sera. In desorption we have received from 0.026 up to 0.150 mg of antigen proteins. For molecular weight estimation isolated proteins have been labeled by ^{125}I and run on SDS/PAGE with autoradiography. Autoradiography shown us two lines with 67 kDa and 55 kDa and low weight protein line.

Conclusions: Isolation of pituitary autoantigen by affinity chromatography shown two different antigen proteins with 67 kDa and 55 kDa. (*Pol J Endocrinol* 2009; 60 (6): 455–460)

Key words: pituitary autoantigen, isolation, pituitary autoantibodies



Dr n. med. Paweł Gut, Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań, tel.: 061 869 13 30; tel. kom.: 607 392 922, faks: 061 869 16 82, e-mail: gutpj@poczta.onet.pl

Wstęp

Występowaniem przeciwciał przysadkowych zainteresowano się po raz pierwszy w 1962 roku, kiedy to Goudie i Pinkerton [1] zaobserwowali zanik przysadki u młodej kobiety z wolem Hashimoto. Jednak systematyczne badania dotyczące tego problemu rozpoczęły się w latach 70. XX wieku. W latach 1974–1975 Bottazzo i wsp. [2, 3] wykazali metodą immunofluorescencyjną, że u chorych z chorobą Addisona można stwierdzić niejednokrotnie obecność przeciwciał narządowych. Stwierdzili oni również [4–6], że przeciwciała skierowane są przeciw składnikom błon komórkowych oraz frakcji mikrosomalnej komórek. W 1982 roku Bottazzo [7] opublikował dane dotyczące występowania przeciwciał przeciwwyspowych i przeciwprzysadkowych u chorych na cukrzycę typu 1. Crock [8] badał występowanie przeciwciał przysadkowych z zastosowaniem immunoblottingu w różnych endokrynopatiach na podłożu autoimmunologicznym, używając autoantygenów przysadkowych izolowanych z frakcji cytozolowej przysadek. Badania te wykazały obecność przeciwciał przeciw białku ludzkich przysadek o ciężarze 40 kDa i 49 kDa u 70% chorych z limfocytarnym zapaleniem przysadki oraz u 42% pacjentów z chorobą Addisona i 15% z chorobą Gravesa-Basedowa.

Identyfikacja i charakterystyka autoantygenów swoistych dla danych gruczołów wydzielania wewnętrznego stanowi integralną część w zrozumieniu patogenyzy chorób autoimmunologicznych. W większości przypadków, swoiste narządowo autoantygeny są cząsteczkami białkowymi o dobrze poznanej aktywności i funkcji jak enzymy, receptory czy też inne struktury komórkowe [9]. W związku z tym celem niniejszej pracy była próba izolacji autoantygenu przysadkowego, z zastosowaniem surowic chorych o wysokim mianie autoprzeciwciał przysadkowych, oraz frakcji mikrosomalnej ludzkich przysadek.

Izolację antygenu przysadkowego prowadzono metodą chromatografii powinowactwa, wykorzystując immunosorbent sporządzony z immunoglobulin izolowanych z surowic wspomnianych chorych.

Materiał i metody

Do badań autorzy niniejszej pracy wybrali surowice pacjentów z chorobami przysadki oraz z chorobą Addisona i Gravesa-Basedowa wykazujące silną reakcję immunologiczną z białkami frakcji mikrosomalnej przysadek o ciężarach właściwych 55 kDa, 60 kDa i 67 kDa, jako najczęściej występujące.

Frakcję mikrosomalną przysadek ludzkich, wykorzystywaną do izolacji autoantygenu przysadkowego, otrzymywano metodą ultrawierowania i solubilizacji

w 1-procentowym roztworze dezoksycholanu sodu (DOC). Do izolacji zastosowano ludzkie przysadki otrzymywane z autopsji, przechowywane do czasu izolacji frakcji mikrosomalnej w temperaturze -70°C .

Zasadniczymi etapami wyżej wymienionej metody były:

- izolacja autoprzeciwciał przysadkowych z surowicy chorych o wysokim mianie autoprzeciwciał na kolumnie sefaroza 4B–białko A (retencja IgG na kolumnie);
- desorpcja zatrzymanych na kolumnie IgG 0,56-procentowym kwasem octowym;
- sporządzenie immunosorbentu, czyli immobilizacja IgG na podłożu stałym CNBr-aktywowanej sefarozie;
- sączenie solubilizowanych białek mikrosomalnych przysadki przez immunosorbent;
- usunięcie białek nieswoiście zaadsorbowanych;
- eluowanie antygenu glicyną i guanidyną z następującą dializą i liofilizacją;
- analiza czystości antygenu mikrosomalnego;
- określenie masy cząsteczkowej antygenu mikrosomalnego.

Etap 1 i 2: Izolacja immunoglobulin G

Z surowic chorych o wysokim mianie autoprzeciwciał przysadkowych izolowano immunoglobuliny na kolumnie z zastosowaniem złoża sefaroza 4B–białko A. Kolumnę sporządzono z 1 g sefarozy. Na tak przygotowaną kolumnę nanoszono 1–1,5 ml surowicy pacjenta i inkubowano. Nie zaadsorbowane na żelu białka surowicy wypłukiwano z kolumny 20 ml buforu fosforanowo-solnego (PBS). Związane z białkiem A — sefarozą immunoglobuliny desorbowano 0,56-procentowym kwasem octowym. Stężenie białka w eluacie oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm.

Etap 3: Przygotowanie immunosorbentu

W celu sporządzenia immunosorbentu immunoglobuliny pacjentów sprzęgano kowalencyjnie z CNBr-aktywowaną sefarozą. Na kolumnę utworzoną z 1 g CNBr-sefarozy nanoszono wcześniej wyizolowane immunoglobuliny. Dla usunięcia niezwiązanych z żelem immunoglobulin kolumnę płukano 5-krotnie buforami o zmiennym pH, na zmianę 0,1 mol/l buforem octanowym o pH 4,0 i 0,05 mol/l buforem boranowym o pH 8,6.

Etap 4 i 5: Izolacja autoantygenu przysadkowego

Na kolumnę immunosorbentu nanoszono solubilizowane białka mikrosomalne przysadek w ilościach 30–50 mg w 4 ml 0,05 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,4 z dodatkiem 0,1-procentowego DOC. Inkubację prowadzono 3 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie kolumnę płukano 0,05 mol/l buforem fosforanowym w celu usunięcia niezwiązanych białek, do czasu uży-

Tabela I. Wyniki izolacji IgG z surowic chorych z przeciwciałami przysadkowymi

Table I. The results of IgG isolation from pituitary antibodies patients sera

Lp	Pacjent	Rodzaj choroby	Płeć (K/M)	Wiek (lata)	Ciężar drobinowy autoantygenów SDS-PAGE i Western-blotting (kDa)	Objętość surowicy [ml]	Ilość wyizolowanego IgG [mg]
1.	P.J.	Akromegalia	M	54	67 kDa	1,5 ml	12,8 mg
2.	U.W.	Prolaktynoma	M	49	55 kDa, 60 kDa, 67 kDa	1 ml	8,2 mg
3.	K.H.	Empty sella	M	31	55 kDa, 60 kDa, 67 kDa	1,5 ml	11,2 mg
4.	J.M.	Empty sella	K	43	55 kDa, 60 kDa, 67 kDa	1,5 ml	13,5 mg
5.	M.M.	Hypopituitarismus	K	48	18 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 67 kDa	1,5 ml	10,4 mg
6.	C.L.	Choroba Addisona	K	35	67 kDa	1 ml	9,3 mg
7.	P.W.	Choroba Addisona	K	50	55 kDa, 60 kDa, 67 kDa	1,5 ml	10,2 mg
8.	M.M.	Choroba Addisona	K	50	55 kDa, 67 kDa	1,5 ml	10,8 mg
9.	R.K.	Choroba Gravesa-Basedowa	M	58	55 kDa	1 ml	8,5 mg
10.	R.A.	Choroba Gravesa-Basedowa	M	41	67 kDa	1,5 ml	12,2 mg
11.	M.P.	Choroba Gravesa-Basedowa	K	37	67 kDa	1,5 ml	11,7 mg
12.	M.G.	Choroba Gravesa-Basedowa	K	52	55 kDa	1,5 ml	10,9 mg

skania spektrofotometrycznie absorbancji poniżej 0,01 (OD 280 nm).

Etap 6: Desorpcja białek antygenowych

Desorpcji związanych z przeciwciałami białek antygenowych dokonano przy użyciu 0,2 mol/l buforu glicyny-HCL o pH 2,8 i guanidyny (1 mol/l i 3 mol/l), zbierając frakcje 1 ml do probówek zawierających bufor fosforanowy 0,05 mol/l o pH 7,4. Zawartość białka oceniano spektrofotometrycznie (OD 280 nm).

Etap 7 i 8: Analiza czystości oraz ocena masy cząsteczkowej antygenu mikrosomalnego

Wyizolowane białka liofilizowano, a następnie rozdzielano elektroforetycznie w 12-procentowym żelu poliakrylamidowym (1,5M TRIS-HCL), stosując niskocząsteczkowe standardy jako markery masy cząsteczkowej.

Wyniki

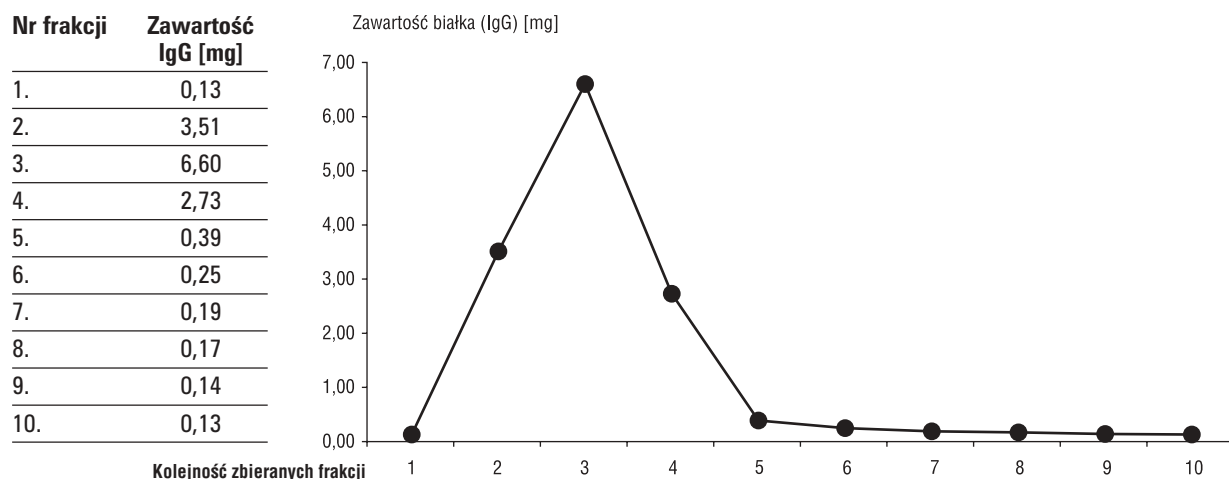
Do izolacji immunoglobulin użyto surowice pacjentów z chorobami przysadki, chorobą Addisona oraz chorobą Gravesa-Basedowa, które wykazywały silną reakcję immunologiczną z białkami frakcji mikrosomalnej przysadek o ciężarach 55 kDa, 60 kDa i 67 kDa. Jednocześnie były to surowice, które reagowały z jak najmniejszą liczbą białek antygenowych ludzkich przysadek. Izolację IgG przeprowadzono na kolumnie sefaroza 4B-białko A. Izolację immunoglobulin przeprowadzono 12-krotnie, a wyniki przedstawiono w tabeli I. Przykładową proporcję zawartości białka w poszczególnych frakcjach otrzymanych podczas desorpcji IgG z surowicy chore-

go o wysokim mianie autoprzeciwciał przysadkowych przedstawiono na rycinie 1.

Dializowane immunoglobuliny pacjentów sprzęgano kowalencyjnie z CNBr-aktywowaną sefarozą. Sprzęganie takie wykonano 10-krotnie. Wydajność sprzęgania immunoglobulin każdorazowo kontrolowano, dodając do 10 mg IgG także znakowaną 125 I-IgG. Po intensywnym płukaniu żelu buforem PBS pomiar radioaktywności zatrzymanej na kolumnie wynosił 70%, co wskazywało, że 70% IgG, czyli 7 mg zostało związane z sorbentem (agarozą).

Dla izolacji autoantygeny przysadkowego, na przygotowaną kolumnę immunosorbentu nanoszono solubilizowane białka mikrosomalne ludzkich przysadek w celu przeprowadzenia chromatografii powinowactwa. Powyższej izolacji białek antygenowych przysadki dokonano 10-krotnie, nanosząc na kolumnę za każdym razem 30–50 mg białek mikrosomalnych ludzkich przysadek otrzymanych drogą ultrawierowania.

Desorpcję białek antygenowych przeprowadzono przy użyciu glicyny oraz guanidyny, zbierając 10 frakcji eluatu o objętości 1 ml. Zawartość białka oznaczono spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm. Z obserwacji autorów niniejszej pracy wynika, że największe stężenie izolowanych białek uzyskano w 2. i 3. frakcji oraz, że bufor glicynowy desorbował w poszczególnych badaniach 2–3-krotnie większą ilość białka niż w dalszym etapie desorpcji używany roztwór guanidyny. Dalsze badania autorów niniejszej pracy wykazały, że w metodzie fazy stałej RIA antygeny desorbowane glicyną nie straciły zdolności wiązania przez przeciwciała przysadkowe. Natomiast białka antygenowe



Rycina 1. Zawartość białka w poszczególnych frakcjach podczas desorpcji IgG z surowicy chorego z akromegalią (pacjent nr 1, w tab. I)

Figure 1. The results of IgG isolation from sera of patient with acromegaly (patient nr 1 from table I)

Tabela II. Wyniki desorpcji antygenów przysadkowych z immunosorbentu

Table II. The results of pituitary antigens desorption from immunosorbent

	Ilość sączonych białek mikrosomalnych przysadek	Desorpcja 0,2 mol/l glicyna-HCl pH 2,8	Guanidyna-HCl 1 mol/l, 3 mol/l
1.	50 mg	0,148 mg	0,082 mg
2.	50 mg	0,124 mg	0,056 mg
3.	50 mg	0,054 mg	0,090 mg
4.	50 mg	0,060 mg	0,032 mg
5.	100 mg	0,075 mg	0,026 mg
6.	35 mg	0,112 mg	0,055 mg
7.	32 mg	0,118 mg	Nie wykonano
8.	32 mg	0,150 mg	Nie wykonano
9.	32 mg	0,120 mg	Nie wykonano
10.	25 mg	0,042 mg	Nie wykonano

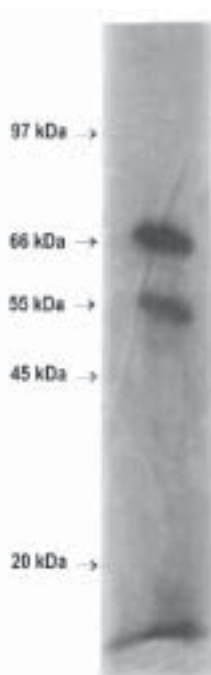
desorbowane guanidyną po liofilizacji z trudem rozpuszczały się w buforze i w mniejszym stopniu były wiązane przez przeciwciała przysadkowe. Z tego względu w dalszych badaniach dokonywano desorpcji wyłącznie buforem glicynowym o pH 2,8. Wyniki powyższych badań przedstawiono w tabeli II.

W celu określenia masy cząsteczkowej i czystości antygenu mikrosomalnego przysadek, uzyskanego drogą chromatografii powinowactwa, wyizolowane białka były znakowane izotopem ^{125}I metodą chloraminową [10] oraz rozdzielone elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) z następową autoradiografią. Wyniki autoradiogramów wykazały obecność dwóch silnie zaznaczonych prążków białek radioaktywnych o masie 67 kDa i 55 kDa oraz białka niskocząsteczkowe (ryc. 2).

Dyskusja

Identyfikacja swoistych narządowo autoantygenów umożliwia potwierdzenie autoimmunologicznego charakteru choroby, jak również pozwala ocenić tło odpowiedzi immunologicznej zarówno ze strony limfocytów B, jak i T. Próby wyizolowania autoantygenów odpowiedzialnych za procesy autoagresji otwierają wiele możliwości opracowania i rozwoju metod oznaczania autoprzeciwciał i ich charakterystyki [11, 12].

W świetle dotychczasowych badań [13, 14], znając reakcję białek antygenowych ze swoistymi autoprzeciwciałami, stosuje się izolację i oczyszczanie autoantygenów z natywnych tkanek ludzkich przez zastosowanie metod, takich jak: chromatografia powinowactwa, cieczowa chromatografia kolumnowa, chromatografia



Rycina 2. Znakowane ^{125}I — białka antygenowe przysadek po izolacji metodą chromatografii powinowactwa oraz rozdzielone metodą SDS-PAGE/Western-blottingu (żel 12,5%) z następową autoradiografią. Widoczne wyraźne dwa prążki o masie 67 kDa i 55 kDa oraz białka niskocząsteczkowe

Figure 2. Labeled ^{125}I — pituitary antigen proteins after affinity chromatography isolation on SDS-PAGE/Western-blotting (gel 12.5%) with autoradiography. Visible two lines 67 kDa and 55 kDa and low weight proteins

ogniskowania czy też wysokociśnieniowa chromatografia przepływowa.

Wyniki badania Komatsu i wsp. [15] sugerowały powiązanie obecności przeciwciał skierowanych przeciw komórkom przysadki z atrofią przysadki i zespołem pustego siodła. Hansen i wsp. [16] w badaniach immunocytochemicznych stwierdzili obecność przeciwciał przysadkowych reagujących przede wszystkim z komórkami syntetyzującymi hormon wzrostu i prolaktynę.

Wercammen i wsp. [17] opisali w surowicach chorych ze świeżo rozpoznaną cukrzycą insulinozależną obecność przeciwciał reagujących z antygenami przysadkowymi. Baekkeskov i wsp. [18] w swoich szczegółowych badaniach dowodzą, że przeciwciała te reagują w większości przypadków z białkami antygenowymi ludzkich przysadek o ciężarach drobinowych 22 kDa i 64 kDa. Bensing i wsp. [19] oraz Kasperlik-Zaluska i wsp. [20] opisali obecność przeciwciał przysadkowych w izolowanym niedoborze hormonu adrenokortykotropowego (ACTH, *adrenocorticotrophic hormone*). Do badań wykorzystano białka antygenowe izolowane z frak-

cji cytozolowej, gdzie w 19% przypadków stwierdzono przeciwciała przeciwko antygenowi 36 kDa i 49 kDa. W kolejnych badaniach O'Dwyer i wsp. [21] zidentyfikowali antygen przysadkowy o ciężarze drobinowym 49 kDa jako neurospecyficzną α -enolazę.

Wnioski

W świetle dotychczasowych badań uważa się, że częstość występowania przeciwciał przysadkowych skierowanych przeciw autoantygenom przysadek o ciężarze właściwym 67 kDa w powiązaniu z cukrzycą insulinozależną [22] może sugerować, że autoantygenem przysadkowym (podobnie jak w cukrzycy typu 1) może być dekarboksylaza kwasu glutaminowego (GAD, *glutamic acid decarboxylase*). Jak wynika z danych przytaczanych powyżej, istnieje wiele doniesień opisujących wykładniki procesów autoimmunologicznych związanych z antygenami przysadki, jednak istota tych zmian, ich znaczenie i natura autoantygenów wymagają jeszcze dalszych wyjaśnień. W badaniach własnych próby wyizolowania autoantygeny przysadkowego z zastosowaniem metody chromatografii powinowactwa pozwoliły autorom niniejszej pracy otrzymać dwie frakcje białek antygenowych o różnych ciężarach drobinowych — 67 kDa i 55 kDa. Niestety zarówno ilość, jak i czystość wyizolowanych autoantygenów nie pozwoliła na ich dalszą i dokładniejszą charakterystykę. W związku z tym konieczne są jeszcze kolejne badania, mające na celu otrzymanie oczyszczonej postaci autoantygeny przysadkowego w takiej ilości, aby można było przeprowadzić badania nie tylko jakościowe, ale również ilościowe oraz móc odtworzyć chorobę na modelu zwierzęcym.

Piśmiennictwo

- Goudie RB, Pinkerton PH. Anterior hypophysis and Hashimoto disease in a young woman. *J Pathol Bacteriol* 1962; 83: 584–585.
- Bottazzo GF, Doniach D. Pituitary autoimmunity: a review. *J of the Royal Society of Medicine* 1978; 71: 433–436.
- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Pouplard A. Autoantibodies to prolactin secreting cells of human pituitary. *The Lancet* 1975; 19: 97–101.
- Bottazzo GF, McIntosh C, Stanford W. Growth hormone cell antibodies and partial growth hormone deficiency in a girl with Turner's syndrome. *Clin Endocrinol* 1980; 12: 1–9.
- Doniach D, Bottazzo GF. Pancreatic autoimmunity and diabetes mellitus. *Neth J Med* 1977; 20: 245–247.
- Bottazzo GF, Sotsiou F, Doniach D. Immunofluorescence studies on autoantibodies to steroid-producing cells, and to germ-line cells in endocrine disease and infertility. *Clin Exp Immunol* 1980; 39: 97–111.
- Mirakian R, Richardson CA, Bottazzo GF. Humoral autoimmunity to gut related endocrine cells. *Clin Immunol Newslett* 1981; 2: 161–167.
- Crock PA. Cytosolic autoantigens in lymphocytic hypophysitis. *J Clin Endocrin Metabolism* 1998; 83: 609–618.
- Riley WJ. Enzymes as antigens in autoimmune endocrinopathies. *Clin Chem* 1995; 41: 337–339.
- Kokot F, Stupnicki R. Metody radioimmunologiczne i radiokompetycyjne stosowane w klinice. *PZWL* 1979; 22–24.
- Baker JR. Autoimmune endocrine disease. *JAMA* 1997; 278: 1931–1957.

12. Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett* 1985; 190: 148–153.
13. Furmaniak J, Sanders J, Rees Smith B. Autoantigens in the autoimmune endocrinopathies. *Contemporary Endocrinology: Contemporary Endocrinopathies* 1999; 8: 1–34.
14. Kokot F, Słupnicki R. Metody radioimmunologiczne i radiokompetycyjne stosowane w klinice. *PZWL* 1985.
15. Komatsu M, Kondo T, Yamauchi K. Antipituitary antibodies in patients with the primary empty sella syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 1998; 67: 633–638.
16. Hansen BL, Hegedus L, Hansen GN. Pituitary cell autoantibody diversity in sera from patients with untreated Graves disease. *Autoimmunity* 1989; 5: 49–57.
17. Wercammen M, Gorus F, Foriers A. Presence of immunoglobulin M which bind a rat pituitary cells. *Diabetology* 1989; 32: 611–617.
18. Baekkeskow S, Aanstoot HJ, Christgau S. Identification of the 64 kDa autoantigen in insulin dependent diabetes as the GABA synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347: 151–156.
19. Bensing S, Kasperlik-Zaluska AA, Czarnocka B. Autoantibodies against pituitary proteins in patients with adrenocorticotropin deficiency. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 126–132.
20. Kasperlik-Zaluska AA, Czarnocka B, Czech W. Autoimmunity as the most frequent cause of idiopathic secondary areal insufficiency; report of 111 cases. *Autoimmunity* 2003; 36: 155–159.
21. O'Dwyer DT, Smith AL, Matthew ML. Identification of the 49-kDa autoantigen associated with lymphocytic lymphophysitis as α -enolase. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 752–757.
22. Christie MR, Brown TJ, Cassidy D. Binding of antibodies in sera from type I diabetic patients to glutamate decarboxylase from rat tissues. *Diabetology* 1992; 35: 380–384.